




NON-PEPTIDE IMMUNOLOGIC TRACER PRECURSORS COMPRISING A TYROSYL-(X)N OR LYSINE-(X)N TYROSINE MOTIF, METHOD FOR PREPARING SAME AND USES THEREOF

Patent number: WO03075010
Publication date: 2003-09-12
Inventor: CUPO ANNY (FR); LE SAINT CECILE (FR); VINCENT JEAN-PIERRE (FR)
Applicant: CENTRE NAT RECH SCIENT (FR); CUPO ANNY (FR); LE SAINT CECILE (FR); VINCENT JEAN-PIERRE (FR)
Classification:
- **international:** G01N33/532
- **european:** G01N33/532
Application number: WO2003FR00707 20030305
Priority number(s): FR20020002783 20020305

Also published as:

 WO03075010 (A3)
 FR2836996 (A1)

Cited documents:

 US3925355
 US5380825
 XP002230571
 XP008020930
 XP002196958
more >>

Report a data error here

Abstract of WO03075010

The invention concerns an immunologic tracer characterized in that it comprises a non-peptide hapten coupled with a TYR-(X)_n-LYS or LYS-(X)_n-TYR motif, wherein X is selected among a single bond, an amino acid, except for Lysine, Glutamine, Asparagine or Tyrosine, a succinyl group, a citrate group, a hydroxymethyl-(CH(OH)- group, a methylene group: -CH₂-, an oxygen atom, a sulphur atom, an oxyethylene-CH₂-O- group, or a methylamine -CHNH- group, and n is an integer ranging between 1 and 20, preferably between 1 and 10, more preferably between 1 and 2. The invention also concerns methods for preparing said precursors, the use thereof for preparing immunologic markers useful in competitive immunologic assays.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
12 septembre 2003 (12.09.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/075010 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

G01N 33/532

(74) Mandataires : **BREESÉ, Pierre.** etc.; 3 avenue de
l'Opéra, F-75001 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR03/00707

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international : 5 mars 2003 (05.03.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :

02/02783 5 mars 2002 (05.03.2002) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE -CNRS- [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794
Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **CUPO,**
Anny [FR/FR]; 2 avenue Edmont d'Esclevin, F-06160
Juan-Les-Pins (FR). **LE SAINT, Cécile** [FR/FR]; 34
allée des Micocouliers, Hameau de Puissanton, F-06220
Vallauris (FR). **VINCENT, Jean-Pierre** [FR/FR]; Le Riou
C, Domaine du Loup, F-06800 Cagnes-sur-Mer (FR).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: NON-PEPTIDE IMMUNOLOGIC TRACER PRECURSORS COMPRISING A TYROSYL-(X)<SB>N</SB> OR LY-
SINE-(X)<SB>N</SB> TYROSINE MOTIF, METHOD FOR PREPARING SAME AND USES THEREOF

(54) Titre : PRECURSEURS DE TRACTEURS IMMUNOLOGIQUES NON-PEPTIDIQUES COMPRENANT UN MOTIF TY-
ROSYL-(X)_N -LYSINE, OU LYSINE-(X)_N -TYROSINE, PROCÉDE DE PRÉPARATION ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention concerns an immunologic tracer characterized in that it comprises a non-peptide hapten coupled with a TYR-(X)_n-LYS or LYS-(X)_n-TYR motif, wherein X is selected among a single bond, an amino acid, except for Lysine, Glutamine, Asparagine or Tyrosine, a succinyl group, a citrate group, a hydroxymethyl-(CH(OH)- group, a methylene group: -CH₂-, an oxygen atom, a sulphur atom, an oxyethylene-CH₂-O- group, or a methylamine -CHNH- group, and n is an integer ranging between 1 and 20, preferably between 1 and 10, more preferably between 1 and 2. The invention also concerns methods for preparing said precursors, the use thereof for preparing immunologic markers useful in competitive immunologic assays.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un précurseur d'un traceur immunologique caractérisé en ce qu'il comprend un haptène non peptidique couplé à un motif TYR (X)_n-LYS ou LYS-(X)_n-TYR dans lequel X est choisi parmi une liaison simple, un acide aminé, à l'exception de Lysine, Glutamine, Asparagine ou Tyrosine, un groupe succinyle, un groupe Citrate, un groupe hydroxyméthyle -CH(OH)-, un groupe méthylène: -CH₂-, un atome d'oxygène, un atome de soufre, un groupe oxyéthylène -CH₂-O-, ou un groupe méthylamine -CHNH- et n est un nombre entier compris entre 1 et 20, de préférence entre 1 et 10, tout préférentiellement entre 1 et 2. L'invention concerne également des procédés de préparation desdits précurseurs l'utilisation de ces derniers pour la préparation de marqueurs immunologiques utiles dans les dosages immunologiques par compétition.

WO 03/075010 A2

PRECURSEURS DE TRACEURS IMMUNOLOGIQUES NON-PEPTIDIQUES
COMPRENANT UN MOTIF TYROSYL-(X)_n-LYSINE, OU LYSINE-(X)_n-
TYROSINE, PROCEDE DE PREPARATION ET LEURS APPLICATIONS

5 La présente invention concerne le domaine de l'immunologie analytique et en particulier la préparation de traceurs utiles pour les dosages immunologiques d'haptènes.

10 Parmi toutes les méthodes permettant la quantification dans les milieux biologiques comme par exemple le contenu intracellulaire, le sang, le liquide céphalorachidien (LCR), la salive, ou l'urine, des petites molécules, telles que celles utilisées en
15 thérapie anti-VIH, ou en cancérologie, les dosages immunologiques, présentent de nombreux avantages en termes de sensibilité, car ils sont adaptés à la mesure de concentrations intracellulaires faibles desdites molécules et aussi en termes de rapidité du fait du temps de préparation des échantillons.

20 Les dosages d'haptènes, molécules de faible taille, sont effectués au moyen de dosages immunologiques spécifiques, ci-après nommés « dosages par compétition » dans lesquels, l'haptène à doser est mis en présence d'un anticorps spécifique, l'anticorps anti-haptène. La
25 liaison entre ces deux molécules, l'haptène et l'anticorps anti-haptène, est mesurée en présence d'une troisième molécule, analogue de l'haptène, généralement marquée, appelée « traceur ».

30 Ces dosages autorisent leur réalisation avec des échantillons de taille réduite, tant en volume comme en nombre de cellules, ils peuvent être réalisés en mélange complexe et sont bien adaptés au suivi de patients en milieu hospitalier.

Dans le cadre de la présente invention, les termes suivants ont la signification ci-dessous indiquée :

5 Haptène : Une molécule de petite taille, ayant en général un poids moléculaire inférieur à 5000 daltons susceptible d'avoir des propriétés antigéniques et d'induire une réponse immune seulement lorsqu'elle est couplée à une molécule porteuse de plus grande taille.

10 Molécule porteuse : Une molécule de poids moléculaire élevé, en général supérieur à 50000 daltons et capable d'induire une réponse immune chez un animal auquel elle est administrée. Lorsqu'il s'agit d'une protéine, la molécule porteuse doit être phylogénétiquement éloignée de l'espèce dans laquelle
15 l'immunisation est réalisée.

Antigène : Une molécule contre laquelle le système immunitaire est capable de réagir. On désigne par antigène également une molécule qui réagit avec un anticorps spécifique de ladite molécule.

20 Immunogène : un antigène, en particulier lorsque celui-ci est obtenu par couplage d'un haptène et d'une molécule porteuse afin de permettre au premier d'induire une réponse immune et en particulier une réponse humorale avec production d'anticorps ayant une
25 affinité pour ledit haptène.

Traceuse : molécule dérivée d'un analogue d'un haptène comportant un marqueur.

30 Précurseur d'un traceur : molécule dérivée d'un analogue d'un haptène susceptible de réagir avec un marqueur pour obtenir ledit traceur.

Marqueur : Une molécule ou une particule ayant des propriétés physico-chimiques, telle que l'émission ou

l'absorption d'énergie lumineuse, radioactive ou autre, permettant sa détection, par tout moyen.

A titre d'exemple de marqueurs, on peut citer : des enzymes, des isotopes radioactifs, des fluorochromes.

L'emploi de "*" indique un composé marqué radioactivement, particulièrement à l'Iode¹²⁵

Des dosages immunologiques des molécules de faible taille qui ont une importance toute particulière en matière de santé publique, sont par exemple les dosages des analogues nucléosidiques et non-nucléosidiques, souvent utilisés lors des traitements anti-viraux tels que ceux utilisés pour l'inhibition de la protéase ou de la transcriptase inverse du VIH ou dans des nombreux traitements anti-cancéreux, tels que le methotrexate ou la vincristine ou lorsqu'il s'agit de détecter des traces de molécules lors des dépistages des drogues telles que les narcotiques, ou lors de la détection d'hormones non-peptidiques, ou encore des neuromédiateurs.

Dans le cadre de la présente invention, on entend par :

- nucléoside naturel : une molécule constituée par l'association d'une base purique (adénine ou guanine) ou pyrimidique (cytosine, uracile et thymine) avec un résidu pentose (bêta-D-ribofuranose ou bêta-D-deoxyribofuranose).

- analogue nucléosidique (AN): toute molécule composé d'une base modifiée ou non couplée à un ribose ou à un analogue de celui-ci.

Des tels analogues sont par exemple décrits dans le document : (Périgaud, C. et al. Nucleosides and

Nucleotides 1992, vol. 11(2-4), pages 903-945).

Ainsi par rapport à un nucléoside naturel, un analogue peut comporter des modifications du ribose, comme par exemple celles mentionnées page 607 du document précité, telles que la substitution d'un ou plusieurs atomes, le déplacement de la liaison entre la base et le sucre, des inversions anomériques (bêta-alpha), l'addition de fonctions diverses, l'inversion, substitution ou élimination de groupements hydroxyles, la modification de la taille du cycle (pyranose), l'inversion de la configuration (D-L) ou encore la rupture du cycle (acyclonucléosides) ou des modifications de la base hétérocyclique comme par exemple celles indiquées page 908 dudit document, pour les analogues : Fura, FdUrd, Thi-Gua, 6-MP, AraC ou Fludarabine phosphate.

A titre d'exemple de tels analogues de nucléosides, on peut également citer :

Adénosine, S-Adenosyl-L-méthionine, 3'-Azido-3'-deoxythymidine, Carbovir, Cordycepine, Cytidine, Cytosine-b-D-arabinoside, Deoxycytidine, Deoxytubercidine, 2'-Deoxyuridine, Formycine A, Formycine B, Ganciclovir, Guanosine, Inosine, Puromycine, Ribavirine, Sangivamycine, Saquinavir, Thymidine, Tubercidine, Uridine.

D'autres haptènes dont le dosage est particulièrement intéressant son, par exemple, les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse INNTI. Il existe environ 30 familles d'inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse qui vont se fixer au niveau d'une poche hydrophobe de la transcriptase inverse.

Les premiers INNTI ont été une benzodiazépine

(TIBO) et la 1-(2-hydroxyéthoxyméthyl)-9-(phénylthio)thymine (HEPT) et à ce jour une trentaine de classes d'INNTI ont été développées.

5 Parmi les INNTI les plus utilisés on peut citer : les dipyridodiazépinones, comme la Névirapine, les pyridinones, les bis(hétéroaryl)pipérazines, les dérivés TSAO, les alpha-anilinophénylacétamide (alpha-APA), les quinoxalines, la benzoxaninone DMP266 (Efavirenz).

10 En ce qui concerne le développement de traceurs adaptés aux tests immunologiques, la visualisation de protéines de liaison, telles que des récepteurs, des anticorps, voire des enzymes, a été à l'origine du développement de nombreux traceurs résultant
15 d'astuces technologiques.

Les techniques de marquage ont favorisé l'émergence de traceurs modifiés dans des régions n'affectant pas leur interaction avec la molécule cible, permettant à ce traceur d'avoir la meilleure affinité
20 vis-à-vis de la protéine de liaison. Ce concept s'est aussi bien appliqué aux interactions ligand-récepteur qu'aux interactions antigène-anticorps.

En ce qui concerne le développement d'un traceur radioactif ou enzymatique permettant la
25 caractérisation d'anticorps anti-haptène et la mise au point des tests immunologiques correspondants, plusieurs stratégies ont été adoptées.

Pour le marquage radioactif, le plus souvent, certains travaux rapportent le couplage à la molécule
30 d'intérêt, d'un des deux acides aminés susceptibles d'être radiomarqués à l'iode, l'histidine et la tyrosine. La tyrosine peut être introduite en utilisant la tyrosine méthyl ester, la tyramine ou le dipeptide Glycyl-

Tyrosine. (Boulenguez P et al.; J Neurochem 1992 Mar;58(3):951-9 Biochemical and pharmacological characterization of serotonin-O-carboxymethylglycyl[¹²⁵I] iodotyrosinamide, a new radioiodinated probe for 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} binding sites. et Garrigues AM. et al. FEBS Lett 1987 Nov 30;224(2):267-71, Haloperidol-succinylglycyl[¹²⁵I] iodotyrosine, a novel iodinated ligand for dopamine D₂ receptors).

L'introduction d'un groupement absorbant dans la gamme de l'ultraviolet (UV), tel que le résidu Tyr, permet de plus de suivre la formation et la purification du traceur par spectrométrie ultraviolette.

D'autre part, pour l'obtention d'un traceur enzymatique, la stratégie la plus fréquemment utilisée a été celle de coupler l'haptène sur les groupements amino d'une enzyme, telle que par exemple la peroxydase, la phosphatase alcaline, l'acétylcholinesterase, etc.

Dans le cas des ligands, le réactif de Bolton Hunter (N-succinimidyl-3(4-hydroxyphenyl) propionate) a été le plus couramment utilisé pour le radiomarquage à l'iode 125. Le radiomarquage peut-être réalisé soit avant soit après le couplage du réactif à la molécule cible. Sur le même principe, il est aussi, possible de réaliser un marquage au ³H en utilisant le propionate de N-hydroxysuccinimide tritié.

Toutefois, il a été observé lors de la mise au point de certains dosages, comme par exemple le dosage immunologique du Saquinavir, que l'antigène couplé au dipeptide Glycyl-Tyrosine n'était pas un traceur adéquat. En effet, l'hémisuccinate du Saquinavir couplé au dipeptide Glycyl-Tyrosine possède une affinité médiocre vis-à-vis de l'anticorps si on la compare à celle du Saquinavir modifié par un chaînon succinyle (forme

hapténique). L'une des hypothèses qui peut rendre compte de cette observation est que la tyrosine, par interaction hydrophobe et/ou par encombrement stérique, interfère dans l'interaction antigène-anticorps.

5 Une des principales exigences de ces tests immunologiques est en effet celle de présenter une bonne sensibilité vis-à-vis de la molécule qui doit être mesurée.

10 La sensibilité du test est définie comme la quantité minimale détectable de façon fiable, généralement obtenue à partir de 15 à 20 % d'inhibition du test.

15 L'IC 50 est définie par la concentration d'antigène non marqué capable d'inhiber 50 % de la liaison antigène-anticorps. Dans les conditions du test immunologique, en utilisant une dilution d'anticorps donnant 50 % de liaison dans un test en compétition et en défaut de réactif, tant d'anticorps comme d'antigène marqué, l'IC 50 est un bon reflet de l'affinité.
20 L'affinité est déterminée par la méthode de Scatchard.

Cette caractéristique des dosages immunologiques dépend de plusieurs facteurs, tels que l'affinité des anticorps mis en jeu, obtenus par immunisation d'un animal avec un immunogène, obtenu par
25 couplage dudit haptène à une molécule porteuse.

Mais dans le cas particulier des dosages immunologiques « par compétition » utilisés pour les dosages de petites molécules, la sensibilité du test immunologique est aussi dépendante de la qualité de la
30 « compétition » entre l'anticorps, la molécule à doser et le traceur qui mime ladite molécule à doser.

Autrement dit, la sensibilité du dosage immunologique « par compétition » dépend de la capacité

du traceur à déplacer la molécule à mesurer, l'haptène, lorsque celle-ci a déjà été reconnue par l'anticorps dirigé contre elle, et s'y trouve liée.

5 Pour que ledit traceur puisse effectuer un tel déplacement, il doit présenter la structure la plus proche possible de celle de l'haptène.

Il faut cependant tenir compte que la structure de l'haptène a souvent été modifiée du fait même de son couplage à la molécule porteuse, pour obtenir
10 l'immunogène.

De ce fait, la structure de l'haptène mis en présence du système immunitaire pour la production d'anticorps spécifiques est quelque peu différente de celle de l'haptène libre et par conséquent les anticorps
15 induits présentent souvent une meilleure affinité pour la structure de l'haptène légèrement modifié que pour la structure de la forme libre non-modifiée.

La demanderesse a maintenant conçu des traceurs immunologiques qui se rapprochent d'avantage de la structure de l'haptène modifié par son couplage à la
20 molécule porteuse que de la structure de l'haptène libre et qui permettent le développement des dosages immunologiques par compétition ayant une sensibilité accrue.

25 Le but étant d'obtenir un traceur dont la structure se rapproche de celle de la forme immunogénique de l'haptène ayant servi à la production des anticorps anti-haptène et vis-à-vis duquel le traceur doit entrer en compétition. Cette caractéristique est essentielle en
30 termes de sensibilité du test immunologique permettant de doser l'haptène.

La présente invention concerne donc un précurseur d'un traceur immunologique comprenant un

haptène non peptidique couplé à un motif TYR-(X)_n-LYS ou LYS-(X)_n-TYR dans lequel X soit choisi parmi une liaison simple, un acide aminé, à l'exception de Lysine, Glutamine, Asparagine ou Tyrosine, un groupe succinyle, un groupe hydroxyméthyle -CH(OH)-, un groupe méthylène -CH₂-, un groupe oxyéthylène -CH₂-O- ou un groupe méthylamine -CHNH- et n est un nombre entier compris entre 1 et 20, de préférence entre 1 et 10, tout préférentiellement entre 1 et 2.

Selon un mode de mise en œuvre préféré, l'haptène non peptidique est couplé à un motif TYR-LYS ou LYS-TYR.

L'introduction dans l'haptène du motif Tyrosyl-(X)_n-Lysine, permet à la fois de réaliser un marquage radioactif aisé et de mimer le lien peptidique entre l'haptène et la protéine porteuse. Le groupement fonctionnel du résidu de Tyrosine, le groupe phénol, est en effet utilisé pour réaliser un radiomarquage à l'iode 125 et le résidu de Lysine mime le lien établi entre l'haptène et la protéine porteuse par l'intermédiaire du groupement fonctionnel amine primaire de sa chaîne latérale.

L'utilisation d'un traceur réunissant ces deux caractéristiques essentielles permet la mise en œuvre de tests radioimmunologiques de haute sensibilité et par conséquent permet la quantification des épitopes reconnus par l'anticorps même lorsque ces derniers sont faiblement représentés dans un milieu biologique.

Le couplage est orienté en faisant réagir le groupement ε amino de la lysine du motif Tyrosyl-(X)_n-Lysine sur un résidu acide carboxylique de l'haptène modifié.

Selon des modes de mise en œuvre préférés, les

précurseur de traceurs immunologiques de l'invention comprennent des haptènes non-peptidiques choisis parmi : des analogues nucléosides, des inhibiteurs non-nucléosidiques, des composés anticancéreux des composés
5 antiviraux (antiprotéases, inhibiteurs d'entrée), des stupéfiants, des drogues, des hormones non-peptidiques, des neuromédiateurs.

Lors que l'haptène est un nucléoside ou un analogue de nucléosides, il peut être choisi parmi des
10 analogues des bases puriques : ou des analogues des bases pyrimidiques comme par exemple : Acyclovir, Adénosine, S-Adenosyl-L-méthionine, 2',3'-dideoxyadénosine (ddA), 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine (d4T), 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine
15 (3TC), 3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT), Carbovir, Cordycepine, Cytidine, Cytosine-b-D-arabinoside, Deoxycytidine, Deoxytubercidine, 2'-Deoxyuridine, Formycine A, Formycine B, Ganciclovir, Guanosine, Inosine, Puromycine, Ribavirine, Sangivamycine,
20 Thymidine, Tubercidine, Uridine, Abacavir, 3-fluoro-2',3'-dideoxythymidine (FLT), Fura, FdUrd, Thi-Gua, 6-MP, AraC ou Fludarabine phosphate.

Lorsque l'haptène est un composé anticancéreux, il peut être choisi parmi toutes les
25 classes d'anticancéreux, tels les antimétabolites, les alcaloïdes les cancérostatiques.

Parmi les produits anticancéreux antimétaboliques, on peut citer :

- des analogues des bases puriques :
30 6-mercaptopurine, cladribine, fludarabine.

- des analogues des bases pyrimidiques :
5-fluoro-uracile, cytarabine, gemcitabine, Tenofovir.

Lorsque l'haptène est un composé antiviral, il

peut être choisi parmi les classes suivantes :
antiprotéases, inhibiteurs d'entrée, inhibiteurs de
l'intégrase ; il peut être choisi parmi : Saquinavir
(SQV), Indinavir (IDV), Nelfinavir (NFV), Ritonavir
5 (RTV), Amprenavir (APV), Lopinavir (LPV), Tipranavir,
Atazanavir, T20 et T22.

Parmi les narcotiques, on peut citer les
psychotropes comme la cocaïne, la morphine, l'héroïne et
leurs dérivés apparentés ou encore les tranquillisants.

10 L'invention a également pour objet un procédé
d'obtention d'un précurseur d'un traceur immunologique
tels que ceux ci-dessus définis comprenant le couplage
entre un dérivé carboxylique de l'haptène et le
groupement ϵ -amine de la Lysine du motif Tyrosyl-(X)n-
15 Lysine.

Parfois, les haptènes possèdent naturellement
un groupe acide carboxylique, parfois il y est introduit
chimiquement, selon des procédés connus de l'homme du
métier, pour permettre leur couplage à une protéine
20 porteuse, comme par exemple l'hémocyanine de Patelle ou
KLH. Dans de tels cas, le couplage est effectué par
formation d'une liaison peptidique entre la fonction
acide carboxylique de l'haptène et les fonctions amines
libres des chaînes latérales des résidus Lysines de la
25 protéine porteuse.

La grande majorité des haptènes ne possèdent
pas de groupement susceptible d'être engagé dans la
formation d'une liaison peptidique avec les résidus
amines libres d'une protéine porteuse de type KLH.

30 Par conséquent, la première étape de la mise
en œuvre des traceurs de l'invention consiste à modifier
ledit haptène de façon à introduire une fonction acide
carboxylique libre, lorsque celle-ci n'est pas présente

naturellement, suivie du couplage du dérivé carboxylique dudit haptène avec le motif Tyrosyl-(X)_n-Lysine.

5 Ainsi, plus particulièrement le couplage est effectué par activation de l'acide carboxylique de l'haptène ou de l'haptène modifié en présence de chloroformiate d'éthyle suivie de la réaction dudit dérivé activé avec le groupement ε-amine de la Lysine du motif Tyrosyl-(X)_n-Lysine ou encore au moyen d'une carbodiimide en présence de N-hydroxysuccinimide.

10 La première étape du couplage entre le dérivé carboxylique de l'haptène et le motif Tyrosyl-(X)_n-Lysine est effectué par activation de la fonction acide carboxylique de l'haptène modifié par le chloroformiate d'éthyle, particulièrement adapté à l'obtention de
15 précurseurs de traceurs utiles pour la détection des inhibiteurs de la protéase du VIH et d'autres antiviraux, tant nucléosidiques que non nucléosidiques, soit par couplage au moyen d'un carbodiimide en présence de N-hydroxysuccinimide, particulièrement adapté à l'obtention
20 de précurseurs de traceurs utiles pour la détection d'analogues nucléosidiques, pour obtenir un intermédiaire réactionnel.

Cet intermédiaire réactionnel réagit avec le groupement amine libre ε de la Lysine lorsque l'on
25 effectue le couplage en milieu tampon à pH compris entre 8 et 10, de préférence à un pH compris entre 8,5 et 9, de façon à favoriser la réactivité du groupement ε amino.

L'invention concerne également un traceur immunologique comportant le précurseur ci-dessus défini
30 ou obtenu par l'un des procédés ci-dessous mentionnés couplé à un marqueur.

Selon un premier mode de réalisation, le traceur de l'invention comporte un marqueur couplé sur le

groupement fonctionnel de la Tyrosine.

Selon un deuxième mode de réalisation, le traceur de l'invention comporte un marqueur sur le groupement fonctionnel de la Lysine.

5 Selon une mise en œuvre préférée, les traceurs immunologiques de l'invention comportent des marqueurs choisis parmi une enzyme, un chromophore, une particule magnétique, une particule colorée, un fluorochrome, la protéine verte de fluorescence (GFP), la fluorescéine, la
10 rhodamine, le red texas, une particule métallique, la biotine, un complexe avidine-biotine, un complexe streptavidine-biotine, couplés sur le groupement α amino libre de la lysine du motif Lys-(X)_n-Tyr .

 Selon un mode de réalisation particulier, le
15 traceur immunologique de l'invention comporte un radioélément sur le résidu tyrosine et de préférence ledit radioélément est choisi parmi les atomes radioactifs : ^{125}I , ^3H .

 Des traceurs particulièrement préférés sont
20 les traceurs immunologiques radioactifs : Saquinavir-HS-K-Y (ou Y-K) ^{125}I , Saquinavir-Citrate-K-Y (ou Y-K) ^{125}I , ddA-HS-K-Y (ou Y-K) ^{125}I , ddA-Citrate-K-Y (ou Y-K) ^{125}I , NFV-Ac- β Ala-K-Y (ou Y-K) ^{125}I , NFV-HS-K-Y (ou Y-K) ^{125}I , NFV-Citrate-K-Y (ou Y-K) ^{125}I , Ritonavir-HS-K-Y (ou Y-K) ^{125}I , Ritonavir-
25 Citrate-K-Y (ou Y-K) ^{125}I , AZT-HS-K-Y (ou Y-K) ^{125}I , AZT-Citrate-K-Y (ou Y-K) ^{125}I , d4T-HS-K-Y (ou Y-K) ^{125}I , d4T-Citrate-K-Y (ou Y-K) ^{125}I , 3TC-HS-K-Y (ou Y-K) ^{125}I , 3TC-Citrate-K-Y (ou Y-K) ^{125}I , IDV-HS-K-Y (ou Y-K) ^{125}I , IDV-Citrate-K-Y (ou Y-K) ^{125}I , et les traceurs immunologiques
30 enzymatiques : Saquinavir-HS-K-Y (ou Y-K) peroxydase, Saquinavir-Citrate-K-Y (ou Y-K) peroxydase, ddA-HS-K-Y (ou Y-K) peroxydase, ddA-Citrate-K-Y (ou Y-K) peroxydase, NFV-HS-K-Y (ou Y-K) peroxydase, NFV-Citrate-K-Y (ou Y-K)

peroxydase, Ritonavir-HS-K-Y (ou Y-K) peroxydase, Ritonavir-Citrate-K-Y (ou Y-K) peroxydase, AZT-HS-K-Y (ou Y-K) peroxydase, AZT-Citrate-K-Y (ou Y-K) peroxydase, d4T-HS-K-Y (ou Y-K) peroxydase, d4T-Citrate-K-Y (ou Y-K) peroxydase, 3TC-HS-K-Y (ou Y-K) peroxydase, 3TC-Citrate-K-Y (ou Y-K) peroxydase, IDV-HS-K-Y (ou Y-K) peroxydase, IDV-Citrate-K-Y (ou Y-K) peroxydase.

L'invention a également pour objet un procédé d'obtention d'un traceur immunologique comprenant une étape de couplage d'un marqueur sur le résidu tyrosine ou sur le résidu lysine d'un précurseur défini ci-dessus ou obtenu par un procédé ci-dessus mentionné.

Selon un mode de réalisation particulier dudit procédé, le motif $\text{TYR}-(\text{X})_n\text{-LYS}$ ou $\text{LYS}-(\text{X})_n\text{-TYR}$ est préalablement marqué avant son couplage à l'haptène non peptidique.

En particulier, le marquage préalable du motif $\text{TYR}-(\text{X})_n\text{-LYS}$ est effectué soit au moyen d'un marqueur radioactif sur le résidu tyrosine soit au moyen d'un marqueur enzymatique sur le résidu lysine.

Dans tous les cas, le suivi de la réaction est effectué par chromatographie liquide haute pression. Les produits de couplage sont caractérisés par spectrométrie de masse (MALDI-TOF).

Pour la préparation de traceurs radioactifs, après purification par chromatographie, chaque dérivé obtenu est radiomarké à l'iode 125. Le radiomarquage est effectué en présence d'iodure de sodium radioactif et d'un oxydant dans un tampon phosphate à pH 7,5.

En fonction de la nature des dérivés et de leur sensibilité à l'oxydation, différents oxydants peuvent être utilisés ; à titre d'exemple, on peut mentionner : la chloramine T, le iodogène, la

lactopéroxydase et la glucose-oxydase.

Les dérivés radiomarqués sont purifiés par chromatographie liquide haute pression utilisant un support, des solvants et des gradients adaptés à chaque
5 molécule.

L'invention a tout particulièrement pour objet les traceurs immunologiques radiomarqués: ANN-Lys-Tyr-¹²⁵I, AN-Lys-Tyr-¹²⁵I.

Encore selon un autre mode de réalisation,
10 l'invention a pour objet un traceur immunologique comportant un marqueur enzymatique sur le résidu lysine et de préférence ledit marqueur enzymatique est choisi parmi le groupe comprenant la peroxydase, la phosphatase alcaline, l'uréase.

15 L'invention est illustrée ci-dessous au moyen d'exemples, non limitatifs dans lesquels on décrit le procédé de préparation de précurseurs de traceurs avec le motif Tyr-(X)n-Lys, des traceurs immunologiques dérivés de ceux-ci, ainsi que leur utilisation pour des dosages
20 immunologiques et au moyen des figures en annexe dans lesquelles :

- la figure 1 illustre l'analyse comparative de la spécificité d'anticorps anti-saquinavir au moyen d'un dosage immunologique mettant en œuvre différents
25 traceurs, parmi lesquels le traceur SQV-HS-Y-K* de l'invention.

- la figure 2 illustre l'étude comparative, à partir d'un échantillonnage de plasmas, entre les techniques de dosage immunologiques, ELISA et RIA
30 utilisant le traceur SQV-HS-K-Y* et chromatographiques pour le Saquinavir et montre une bonne corrélation entre la technique de référence (HPLC) et le dosage RIA mis en œuvre avec le traceur SQV-HS-K-Y*.

PARTIE EXPERIMENTALE. EXEMPLES

1-Protocole de couplage du dipeptide.

Le couplage du dipeptide sur la fonction acide carboxylique de l'haptène modifié peut s'effectuer soit sur la fonction α amino terminale du dipeptide soit sur le groupement ϵ amino de la lysine. Le couplage monodirectionnel sur l'une ou l'autre de ces deux fonctions amines peut être favorisé en utilisant des conditions de pH et de rapport de concentrations particulières. Il faut ensuite isoler le produit de couplage par purification par chromatographie liquide haute pression (CLHP). Le choix des conditions expérimentales, c'est-à-dire l'orientation du couplage, est dicté par la nécessité d'obtenir la meilleure adéquation entre la structure de la forme immunogénique et celle du traceur de façon à obtenir la meilleure affinité pour le test immunologique.

A) Protocole utilisé pour les antiprotéases modifiées :

Pour les antiprotéases modifiées contenant une fonction acide carboxylique libre, les conditions de couplage au dipeptide Tyrosyl-Lysine ont été les suivantes :

Le couplage s'effectue en deux étapes :

a) la fonction acide carboxylique sur l'haptène (1 équivalent) est préalablement activée par le chloroformiate d'éthyle (2,2 équivalents) dans le diméthylformamide en présence de triéthylamine (2,5 équivalents), pendant 10 minutes à froid (bain eau et glace).

b) le dipeptide Tyrosyl-Lysine (1,5 équivalents), préalablement solubilisé dans un tampon

borate phosphate 50 mM, à pH 8 - 9, est ajoutée au milieu réactionnel.

Le mélange est ensuite placé sous agitation à 4°C. Le suivi du couplage est effectué par chromatographie
5 liquide haute pression.

La réaction est arrêtée par dilution dans l'eau et congélation, lorsque la quantité du produit de couplage désiré n'évolue plus et/ou lorsque des produits secondaires de la réaction apparaissent.

10 B) Protocole utilisé pour les analogues nucléosidiques modifiées :

La liaison glycosidique des analogues nucléosidiques est sensible en milieu acide. De ce fait l'utilisation du chloroformiate d'éthyle qui libère de
15 l'acide chlorhydrique lors de l'activation de la fonction acide carboxylique est écartée et l'activation est effectuée avec le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) en présence de N-hydroxysuccinimide.

Le couplage s'effectue en deux étapes :

20 a) Après modification de l'hydroxyle en 5' des analogues nucléosidiques du ribose par un chaînon hémisuccinate, la fonction acide carboxylique libre (1 équivalent) est activée en présence de DCC (3,6 équivalents) et de N-hydroxysuccinimide (3,6 équivalents)
25 dans le diméthylformamide durant 3 heures à température ambiante.

b) le dipeptide Tyrosyl-Lysine (1,5 équivalents) est préalablement solubilisé dans un tampon borate phosphate 50 mM, à pH 8,9 et ajoutée ensuite au
30 milieu réactionnel.

Le mélange est agité à température ambiante. Le suivi du couplage est effectué par chromatographie

liquide haute pression sur une colonne C18 phase inverse. Le gradient d'élution est indiqué sur la table 1 ci-dessous,

Table 1

Temps (Min)	H ₂ O (0,1 % TFA)	CH ₃ CN (0,1 % TFA)
0	60	40
5	60	40
45	40	60

5

et la réaction est arrêtée comme décrit précédemment.

2-Protocoles de radiomarquage à l'iode 125.

10 Les conditions d'iodation (nature de l'oxydant et conditions de purification par CLHP) ont été mises au point en fonction de la sensibilité à l'oxydation et à la dégradation de chaque molécule.

15 D'une manière générale, 1 équivalent de Tyrosine et 0,5 équivalent de ¹²⁵INa sont placés dans un tampon Phosphate 250 mM pH 7,5 en présence de l'agent oxydant :

La chloramine T : 10 µg par équivalent de Tyrosine.

20 L'iodogène : 100 µg par équivalent de Tyrosine.

La lactoperoxydase : 50 µg en présence d'eau oxygénée, soit rajoutée au milieu (à raison de 3 fois 10 µl à 0,01% en volume), soit produite *in situ* par l'ajout de glucose oxydase (5 µg) et de glucose (0,5 µmoles).

25 La réaction d'iodation, conduite pendant 1 minute, est arrêtée soit par ajout d'un excès de tyrosine (100 équivalents) soit par ajout de métabisulfite de

sodium ou MBS (10 µg). Le rapport molaire $^{125}\text{I}/\text{Tyr}$ est maintenu inférieur à un tout au long de la réaction pour éviter la formation de diiodotyrosines.

Le support de chromatographie et les conditions d'élution (nature de l'éluant et gradient) utilisés pour la purification sont définis pour chacune des molécules.

RESULTATS

Concernant le Saquinavir, l'accrochage du dipeptide Glycyl-Tyrosine à l'hémisuccinate du Saquinavir entraîne une baisse de l'affinité d'un facteur 100 par rapport à l'hémisuccinate du Saquinavir alors que l'haptène modifié (hémisuccinate du Saquinavir) et le dérivé comprenant le dipeptide Tyrosyl-Lysine sont reconnus avec une bonne affinité et de façon équivalente.

Ce résultat indique que, dans le cas de l'anticorps anti-Saquinavir, le choix du dipeptide Tyrosyl-Lysine est plus judicieux que le dipeptide Glycyl-Tyrosine.

En tenant compte des résultats obtenus pour les antiprotéases, pour les analogues nucléosidiques et notamment la ddA, le couplage du dipeptide Tyrosyl-Lysine à au groupe acide carboxylique de l'haptène modifié par succinylation (en 5' sur le ribose) a été réalisé directement.

1. Caractérisation des anticorps.

Les antiprotéases (Saquinavir (SQV), Nelfinavir (NFV) et Ritonavir (RTV)) et les analogues nucléosidiques, la ddA, l'AZT, le d4T et le 3TC, ont été couplés à la KLH par l'intermédiaire d'un bras intercalant. Les anticorps obtenus chez le lapin ont été caractérisés à l'aide d'un traceur radiomarqué à l'iode

sur l'haptène préalablement modifié par le dipeptide tyrosyl-lysine.

Pour le Saquinavir, les anticorps produits ont été caractérisés de différentes façons : en RIA avec deux traceurs radiomarqués à l'iode 125 et en ELISA avec une forme immobilisée de l'antigène. Dans un premier temps, les anticorps anti-SQV ont été caractérisés en test RIA avec comme traceur l'hémisuccinate du Saquinavir couplé au dipeptide Glycyl-Tyrosine (SQV-HS-G-Y*). L'affinité de ces anticorps vis-à-vis du SQV s'est avérée faible (64 nM). Alors ces anticorps ont été caractérisés en test ELISA avec la forme immobilisée de l'antigène, SQV-HS-BSA sur une phase solide. Les caractéristiques de ces anticorps anti-SQV, établies dans un test ELISA, sont présentées dans le tableau 1 ci-dessous.

TABLEAU 1

Analogues	IC 50 finale (M)
Saquinavir	$2,6.10^{-9}$
SQV-HS	3.10^{-10}
SQV-HS-G-Y	1.10^{-8}

Les acides aminés sont présentés en fonction de la nomenclature internationale.

* représente l'isotope 125 I.

Il est constaté que le dérivé SQV-HS-G-Y est 30 fois moins bien reconnu que l'hémisuccinate du Saquinavir (SQV-HS). Par conséquent, ce dernier a été couplé sur la chaîne latérale de la lysine du dipeptide tyrosyl-lysine afin de mimer le lien établi entre l'haptène et la protéine porteuse. Les anticorps anti-SQV ont été caractérisés en test radioimmunologique avec le SQV-HS-K-Y marqué à l'iode 125. Les caractéristiques des anticorps anti-SQV, établies dans un test RIA avec le traceur SQV-HS-K-Y*, sont présentées dans le tableau 2

ci-dessous.

TABLEAU 2

Analogues	IC 50 finale (M)
Saquinavir	$1,2 \cdot 10^{-8}$
SQV-HS	$4,4 \cdot 10^{-10}$
SQV-HS-K-Y	$6 \cdot 10^{-10}$
SQV-HS-G-Y	$1 \cdot 10^{-8}$
IDV	nI
NFV	nI

nI : non immunoréactif jusqu'à des concentrations de 10^{-3} M.

5 Les caractéristiques des anticorps anti-SQV établies en ELISA et en RIA avec le traceur SQV-HS-K-Y* montrent que le SQV-HS-G-Y est en moyenne 30 fois moins bien reconnu que l'hémisuccinate du Saquinavir. En revanche, le SQV-HS-K-Y est aussi bien reconnu que
10 l'hémisuccinate du Saquinavir.

Afin de généraliser cette approche à d'autres anticorps, nous avons caractérisé les anticorps dirigés contre une autre antiprotéase, le Nelfinavir à la fois avec les traceurs correspondants aux produits de couplage
15 aux dipeptides Glycyl-Tyrosine et Tyrosyl-Lysine. Les résultats obtenus concernant les caractéristiques des anticorps anti-NFV établies dans un test RIA avec les traceurs NFV-Ac- β Ala-G-Y* et NFV-Ac- β Ala-K-Y* sont présentés dans le tableau 3 ci-dessous.

20

TABLEAU 3

	NFV-Ac- β Ala-G-Y*	NFV-Ac- β Ala-K-Y*
	IC50 (M)	IC50 (M)
NFV	$1,5 \cdot 10^{-9}$	$4 \cdot 10^{-9}$
NFV-Ac- β Ala-	$2,8 \cdot 10^{-10}$	$1,7 \cdot 10^{-9}$

COOH		
NFV-Ac- β Ala-G-Y	$3,2 \cdot 10^{-10}$	$6 \cdot 10^{-10}$
NFV-Ac- β Ala-K-Y	$3 \cdot 10^{-10}$	$8,3 \cdot 10^{-10}$
IDV	nI	nI
SQV	nI	nI

12

Les caractéristiques des anticorps anti-NFV montrent que pour cet anticorps, les dosages immunologiques utilisant les traceurs NFV-Ac- β Ala-G-Y* et NFV-Ac- β Ala-K-Y* sont équivalents en termes de sensibilité et de spécificité. De plus, ces deux molécules sont reconnues de façon identique dans chacun des tests indiquant qu'elles sont équivalentes en termes de reconnaissance par l'anticorps.

Par la suite, nous avons directement utilisé ce dipeptide pour produire un traceur afin de caractériser les anticorps dirigés contre la ddA.

Les caractéristiques de ces anticorps anti-ddA établies dans un test RIA avec le traceur ddA-HS-K-Y* sont présentées dans le tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4

Analogues	IC50 (M) \pm SEM
ddA-HS	$4,1 \pm 0,7 \cdot 10^{-11}$ (n=5)
ddA-HS-K-Y	$1,4 \cdot 10^{-10}$
ddA	$3,4 \pm 0,4 \cdot 10^{-9}$ (n=14)
ddI	$1 \cdot 10^{-7}$
3TC	$6,4 \cdot 10^{-4}$
AZT	nI
d4T	nI
ddC	$4 \cdot 10^{-5}$

nI : non immunoréactif jusqu'à des concentrations de 10^{-3} M.

Comme pour les anticorps précédents, le ddA-HS-K-Y est aussi bien reconnu que l'haptène.

D'une manière absolument identique des anticorps anti-RTV, anti-AZT et anti-d4T ont été préparés et leurs caractéristiques mesurées. Les Tableaux 5, 6 et 7 ci-après donne les résultats de ces caractérisations.

Tableau 5 (RTV)

analogues	IC 50 (M) (traceur RTV-HS-(KY ou YK)*)	IC 50 (M) (traceur RTV-HS-ACE)
RTV	$1,2 \cdot 10^{-10}$	$1,4 \cdot 10^{-9}$
RTV-HS	$8 \cdot 10^{-11}$	$1,2 \cdot 10^{-9}$
RTV-HS-(YK ou KY)	$3 \cdot 10^{-11}$	nd

ACE acetyl-cholinesterase traceur enzymatique

10

Tableau 6 (AZT)

analogues	IC 50 (M) (traceur AZT-HS-(KY ou YK)*)
AZT	$6 \cdot 10^{-9}$
AZT-HS	$5 \cdot 10^{-11}$
AZT-MP	$9 \cdot 10^{-8}$
AZT-DP	$2 \cdot 10^{-6}$
AZT-TP	$2 \cdot 10^{-7}$

Tableau 7 (d4T)

analogues	IC 50 (M) (traceur d4T-HS-(KY ou YK)*)
d4T	$7 \cdot 10^{-9}$
d4T-HS	$1 \cdot 10^{-10}$
d4T-MP	$1 \cdot 10^{-7}$
d4T-TP	$3 \cdot 10^{-7}$

La spécificité des anticorps anti-SQV, anti-

NFV, anti-ddA, anti-RTV, anti-Azt et anti-d4T est excellente puisque aucune réactivité croisée n'est observée vis-à-vis des autres antiviraux utilisés en
5 d'interférence avec des composants des milieux biologiques tels que les protéines plasmatiques, le contenu intracellulaire, ou le milieu de culture dans les tests in vitro, autorise le dosage brut sans purification préalable des échantillons.

10 L'étude comparée des spécificités montre que l'affinité du test immunologique obtenu avec le traceur (KY ou YK)* permet d'augmenter la sensibilité d'un facteur 10.

15 2. Applications cliniques.

On peut constater que les résultats des dosages RIA sont comparables à ceux obtenus par HPLC et permettent la quantification du SQV plasmatique.

20 Les résultats des dosages par ELISA sont très différents de ceux obtenus par HPLC. Le test ELISA étant plus sensible aux interférences protéiques que le dosage RIA, une façon de s'affranchir de ces interférences serait d'extraire le SQV des échantillons biologiques.

25 Aussi, puisque l'étude de la spécificité des anticorps montre que l'hémisuccinate du Saquinavir est 100 fois mieux reconnu, l'optimisation du test pourrait passer par la succinylation du SQV des échantillons biologiques.

3. Conclusions.

30 Les travaux expérimentaux réalisés dans le cadre de la présente invention et les résultats des tests immunologiques mentionnés dans l'exemple ci-dessous

permettent de conclure que le traceur conçu par la demanderesse, comportant le motif KY permet la réalisation d'un dosage immunologique ayant une bonne sensibilité.

5 Ces résultats confirment que le traceur immunologique conçu dans le cadre de la présente invention, qui tient compte de la reconnaissance de l'épitope par l'anticorps, présente la meilleure adéquation avec l'immunogène.

10 En effet, la comparaison des structures de l'isostère du ddATP et de l'hémisuccinate de la ddA montre des analogies confirmées par la modélisation moléculaire. Cette analogie structurale a été démontrée expérimentalement par le fait que le dérivé ddA-HS-K-¹²⁵IY
15 est parfaitement reconnu par les anticorps anti-isostère du ddATP, de même que le dérivé non radiomarké.

 En effet, dans l'exemple, montré par la demanderesse pour illustrer l'invention, l'haptène est couplé sur les fonctions amines primaires des chaînes
20 latérales des lysines de la protéine porteuse. Par conséquent, en couplant l'haptène sur la chaîne latérale de la lysine du dipeptide tyrosyl-lysine, on mime le lien établi entre l'haptène et la protéine porteuse. Le traceur ainsi obtenu est le plus proche structurellement
25 de la forme immunogénique.

 Prise dans leur ensemble, l'étude de la spécificité des différents anticorps que la Demanderesse a caractérisé montre qu'un précurseur d'un traceur utilisant le dipeptide Tyrosyl-Lysine conduit à
30 l'obtention d'un traceur permettant l'obtention d'un test avec une sensibilité suffisante pour détecter et quantifier des molécules faiblement représentées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Allen RM and Redshaw MR, The use of homologous and heterogenous ^{125}I -radioligands in the radioimmunoassay
5 of progesterone. *Steroids* 1978, 4, 467-486.

Thompson MR, Lutrell M and Giannella RA. Preparation of stable ^{125}I cyclic GMP tyrosine Methyl ester suitable for 3',5 cyclic GMP radioimmunoassay by HPLC. *J. Immunoassay* 1990, 11, 97-108.

10 Muscha I and Toth G. Separation of ^{125}I labelled prostaglandin E2-tyrosine methyl ester by reversed-phase HPLC. *J. Chromatogr* 1988, 438, 111-116.

Sato, K, Miyachi, Y, Mizuchi, A, Ohsawa, N and Kosaka, K. Enzymatic radioiodination of succinyl cyclic
15 AMP tyrosine methyl ester by lactoperoxidase and radioimmunoassay for cyclic AMP. *Endocrinol Jpn.* 1976, 23, 251-257.

Garrigues, AM, Gelhelmann, F, Girault, JM, Delaage MA and M. Labrousse, J, Haloperidol-succinylglycyl (^{125}I) iodotyrosine, a novel iodinated
20 ligand for dopamine D2 receptors. *FEBS Lett*, 1987, 224, 267-271.

Puizillout, JJ and Delaage, MA. Radioimmunoassay of 5-hydroxyindole acetic acid using an
25 iodinated derivative. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1981, 217, 791-797.

Rahmani, R, Barbet J and Cano, JP. A ^{125}I -radiolabelled probe for vindablastine and vindesine
radioimmunoassays : applications to measurements of
30 vindesine plasma levels in man after intravenous injections and long-term infusions. *Clin. Chim. Acta*, 1983, 129, 57-69.

Kato, H, Kido, Y, and Toriqoe, T. Preparation of ^{125}I -labeled estone-tri tyrosine methyl ester. Horm. Metab. Res., 1974, 6, 334-335.

5 Pradelles, P, Grassi, J, Chabardes, D, and Guiso, N. Enzyme immunoassays of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate using acetylcholinesterase. Anal. Chem., 1989, 61, 447-453.

10 Thompson, MR, Luttrell, M, and Giannella, RA. Preparation of stable ^{125}I cyclic GMP tyrosine methyl ester suitable for 3',5'cyclic GMP radioimmunoassay by HPLC. J, Immunoassay, 1990, 11, 97-108.

15 Kaul, S, Stouffer, B, Mummaneni, V, Turabi, N, Mantha, S, Jayatilak, P, and Barbhaiya, R. J of pharmaceutical and Biomedical Analysis 1996, 15, 265-274.

Gaudriault, G and Vincent, JP. Selective labeling of α - or ϵ -amino groups in peptides by the Bolton Hunter reagent. Peptides, 1992, 13, 1187-1192.

20 Gaudriault, G, Zsürger N and Vincent, JP. Radiolabeled ligands specific for the G protein-coupled State of neurotensin receptors J Neurochem, 1996, 67, 2590-2598.

25 Akeb, F, Creminon, C, Nevers, MC, Grassi J, Duval D and Guedj Quantification of Lamivudine (3TC) by competitive immunoassay. Nucleos. and Nucleot. 1999, 18, 893-896.

30 Goujon, L, Brossette, T, Dereutre-Bosquet, N, Creminon, C, Clayette, P, Dormont, D, Mioskowski, C, Lebeau, I, and Grassi, J. Monitoring of intracellular levels of 5'-monophosphate-AZT using an enzyme immunoassay. J. Immunol. Methods, 1998 218, 19-30.

Ferrua, B, Tran, TT, Quaranta, JF, Kubar, J,

Roptin, C, Condom, R, Durant, J and Guedj, R. Measurement of the anti-HIV agent 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine (D4T) by competitive ELISA. J. Immunol. Methods, 1994 176, 103-110.

5 F Portolan, C. Le Saint, D. Duval, A. Cupo, R. Guedj. Mise au point de dosages enzymo-immunologiques (ELISA) sur l'Indinavir, antiprotéases utilisées en chimiothérapie antivirale. 11ème Journée de la Chimie La Garde (Var) 3 avril 1998.

10 R. Guedj, F. Akeb, F. Portolan, A. Cupo, D. Duval, J. Grassi. Dosages immunologiques de la 3TC, de l'Indinavir et de l'AZTTP. 2^{ème} séminaire annuel de recherche clinique « Immunopathologies et stratégies thérapeutiques » ANRS - 10 décembre 1998.

15 C. Le Saint, D. Duval, A. Cupo, R. Guedj. Mise au point d'un dosage enzymo-immunologique du saquinavir, antiprotéases utilisée en chimiothérapie anti-VIH. 12^{ème} Journée de la chimie, Marseille 1999

F. Portolan, F. Akeb, D. Duval, A. Cupo, R. Guedj. Dosage radio-immunologique de l'indinavir. 12^{ème} Journée de la chimie, Marseille 1999.

C. Le Saint, D. Duval, A. Cupo, R. Guedj. Intérêt et mise au point de dosages immunologiques de molécules utilisées en thérapie anti-VIH. 15^{ème} Rencontres Interdisciplinaires de Biochimie. 3-7 mai 1999 Saint Mandrier (Var).

F. Portolan, D. Duval, A. Cupo, R. Guedj. Intérêt et mise au point du dosage radio-immunologique de l'Indinavir, une anti-protéase utilisée en chimiothérapie anti-VIH. 15^{ème} Rencontres Interdisciplinaires de Biochimie. 3-7 mai 1999 Saint Mandrier (Var).

D. Duval, F. Portolan, C. Le Saint, F. Akeb,

T.T. Tran, A. Cupo, R. Guedj. Dosages immunologiques du Saquinavir et de l'Indinavir. 3^{ème} séminaire annuel de recherche clinique sur l'infection par le VIH. 17 décembre 1999 ANRS PARIS.

REVENDEICATIONS

1. Un précurseur d'un traceur immunologique caractérisé en ce qu'il comprend un haptène non peptidique couplé à un motif TYR-(X)_n-LYS ou LYS-(X)_n-TYR
5 dans lequel X est choisi parmi une liaison simple, un acide aminé, à l'exception de Lysine, Glutamine, Asparagine ou Tyrosine, un groupe succinyle, un groupe hydroxyméthyle -CH(OH)-, un groupe méthylène : -CH₂-, un atome d'oxygène, un atome de soufre, un groupe
10 oxyéthylène -CH₂-O-, ou un groupe méthylamine -CHNH- et n est un nombre entier compris entre 1 et 20, de préférence entre 1 et 10, tout préférentiellement entre 1 et 2.

2. Un précurseur selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend un haptène non
15 peptidique couplé à un motif TYR-LYS ou LYS-TYR.

3. Un précurseur selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'haptène non-peptidique est choisi parmi : des nucléosides, des analogues nucléosidiques, des inhibiteurs non-
20 nucléosidiques, des composés anticancéreux, des composés antiviraux (antiprotéases, inhibiteurs d'entrée, inhibiteurs d'intégrase), des stupéfiants, des drogues, des hormones non-peptidiques et des neuromédiateurs.

4. Un précurseur selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'analogue nucléosidique est choisi
25 parmi les analogues de bases pyrimidiques et puriques.

5. Un précurseur selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'analogue nucléosidique est choisi
30 parmi : Acyclovir, Adénosine, S-Adenosyl-L-methionine, 2',3'-didéoxyadénosine (ddA), 2',3'-dideoxy-2',3'-dideoxythymidine (d4T), 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine (3TC), 3'- Azido-3'-deoxythymidine (AZT), Carbovir, Cordycepine, Cytidine, Cytosine-b-D-arabinoside,

Deoxycytidine, Deoxytubercidine, 2'-Deoxyuridine, Formycine A, Formycine B, Ganciclovir, Guanosine, Inosine, Puromycine, Ribavirine, Sangivamycine, Saquinavir, Thymidine, Tubercidine, Uridine, Abacavir, 3-
5 fluoro-2',3'-dideoxythymidine (FLT), Fura, FdUrd, Thi-Gua, 6-MP, AraC ou le Fludarabine phosphate.

6. Un précurseur selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'inhibiteur non-nucléosidique est choisi parmi : une dipyridodiazépinone, une pyridinone,
10 une bis(hétéroaryl)pipérazine, un dérivé TSAO, une alpha-anilinophénylacétamide (alpha-APA), la quinoxaline, la benzoxaninone DMP266 (Efavirenz).

7. Un précurseur selon la revendication 3, caractérisé en ce que le composé anti-cancéreux est
15 choisi parmi : les alcaloïdes les cancérostatiques et des antimétabolites choisis parmi des analogues de bases puriques ou des analogues de bases pyrimidiques.

8. Un précurseur selon la revendication 3, caractérisé en ce que le composé antiviral est choisi
20 parmi Saquinavir (SQV), Indinavir (IDV), Nelfinavir (NFV), Ritonavir (RTV), Amprenavir (APV), Lopinavir (LPV), Tipranavir, Atazanavir, T20 et T22.

9. Un précurseur selon la revendication 3, caractérisé en ce que le stupéfiant est choisi parmi la
25 cocaïne, la morphine, l'héroïne et leurs dérivés apparentés.

10. Procédé d'obtention d'un précurseur d'un traceur immunologique défini à l'une quelconque des
30 revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend le couplage entre un dérivé carboxylique de l'haptène et le groupement ε-amine de la Lysine du motif Tyrosyl-(X)n-Lysine.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le couplage est effectué par activation de l'acide carboxylique de l'haptène en présence de chloroformiate d'éthyle suivie de la réaction dudit dérivé activé avec le groupement ϵ -amine de la Lysine du motif Tyrosyl-(X)n-Lysine.

12. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le couplage est effectué au moyen d'une carbodiimide en présence de N-hydroxysuccinimide.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 12, caractérisé en ce que le couplage est effectué en milieu tampon à un pH compris entre 8 et 10, de préférence à un pH compris entre 8,5 et 9.

14. Un traceur immunologique caractérisé en ce qu'il comprend un précurseur défini à l'une quelconque des revendications 1 à 9, ou obtenu par un procédé défini à l'une quelconque des revendications 10 à 13, couplé à un marqueur.

15. Un traceur immunologique selon la revendication 14, caractérisé en ce que le marqueur est choisi parmi le groupe comprenant : un atome radioactif, une enzyme, une particule magnétique, une particule colorée, un chromophore, un fluorophore, une particule métallique, la biotine, un complexe avidine-biotine, un complexe streptavidine-biotine.

16. Un traceur immunologique selon l'une quelconque des revendications 14 ou 15, caractérisé en ce que le marqueur est couplé sur le groupement fonctionnel de la Tyrosine

17. Un traceur immunologique selon l'une quelconque des revendications 14 ou 15, caractérisé en ce que le marqueur est couplé sur le groupement fonctionnel de la Lysine.

18. Un traceur immunologique selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il comporte un marqueur radioactif sur le résidu tyrosine.

5 19. Un traceur immunologique selon la revendication 18, caractérisé en ce que le marqueur radioactif est choisi parmi les atomes radioactifs : I^{125} , H^3 .

20. Un traceur immunologique selon la revendication 19 choisi parmi : Saquinavir-HS-K-Y (ou Y-K) I^{125} , Saquinavir-Citrate-K-Y (ou Y-K) I^{125} , ddA-HS-K-Y (ou Y-K) I^{125} , ddA-Citrate-K-Y (ou Y-K) I^{125} , NFV-Ac- β Ala-K-Y (ou Y-K) I^{125} , NFV-HS-K-Y (ou Y-K) I^{125} , NFV-Citrate-K-Y (ou Y-K) I^{125} , Ritonavir-HS-K-Y (ou Y-K) I^{125} , Ritonavir-Citrate-K-Y (ou Y-K) I^{125} , AZT-HS-K-Y (ou Y-K) I^{125} , AZT-Citrate-K-Y (ou Y-K) I^{125} , d4T-HS-K-Y (ou Y-K) I^{125} , d4T-Citrate-K-Y (ou Y-K) I^{125} , 3TC-HS-K-Y (ou Y-K) I^{125} , 3TC-Citrate-K-Y (ou Y-K) I^{125} , IDV-HS-K-Y (ou Y-K) I^{125} , IDV-Citrate-K-Y (ou Y-K) I^{125} .

21. Un traceur immunologique selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il comporte un marqueur enzymatique sur le résidu lysine.

22. Un traceur immunologique selon la revendication 21, caractérisé en ce que le marqueur enzymatique est choisi parmi le groupe comprenant la peroxydase, la phosphatase alcaline et l'uréase.

23. Un traceur immunologique choisi parmi : Saquinavir-HS-K-Y (ou Y-K) peroxydase, Saquinavir-Citrate-K-Y (ou Y-K) peroxydase, ddA-HS-K-Y (ou Y-K) peroxydase, ddA-Citrate-K-Y (ou Y-K) peroxydase, NFV-HS-K-Y (ou Y-K) peroxydase, NFV-Citrate-K-Y (ou Y-K) peroxydase, Ritonavir-HS-K-Y (ou Y-K) peroxydase, Ritonavir-Citrate-K-Y (ou Y-K) peroxydase, AZT-HS-K-Y (ou Y-K) peroxydase, AZT-Citrate-K-Y (ou Y-K) peroxydase,

d4T-HS-K-Y (ou Y-K) peroxydase, d4T-Citrate-K-Y (ou Y-K) peroxydase, 3TC-HS-K-Y (ou Y-K) peroxydase, 3TC-Citrate-K-Y (ou Y-K) peroxydase, IDV-HS-K-Y (ou Y-K) peroxydase, IDV-Citrate-K-Y (ou Y-K) peroxydase.

5 24. Procédé d'obtention d'un traceur immunologique caractérisé en ce qu'il comprend une étape de couplage d'un marqueur sur le résidu tyrosine ou sur le résidu lysine d'un précurseur défini à l'une quelconque des revendications 1 à 9.

10 25. Procédé d'obtention d'un traceur immunologique caractérisé en ce qu'il comprend une étape de couplage d'un motif $\text{TYR}-(\text{X})_n\text{-LYS}$ ou $\text{LYS}-(\text{X})_n\text{-TYR}$ préalablement marqué à un haptène non peptidique.

15 26. Procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce que le marquage préalable du motif $\text{TYR}-(\text{X})_n\text{-LYS}$ est effectué au moyen d'un marqueur radioactif sur le résidu tyrosine.

20 27. Procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce que le marquage préalable du motif $\text{TYR}-(\text{X})_n\text{-LYS}$ est effectué au moyen d'un marqueur enzymatique sur le résidu lysine.

1/2

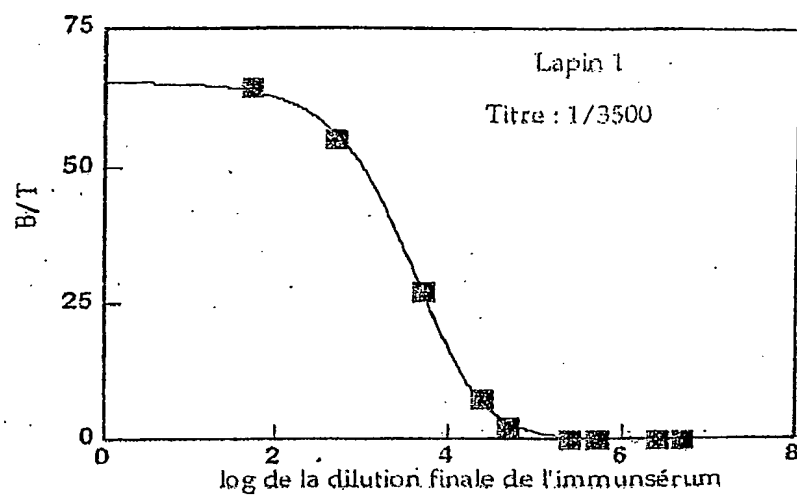


Figure 1A

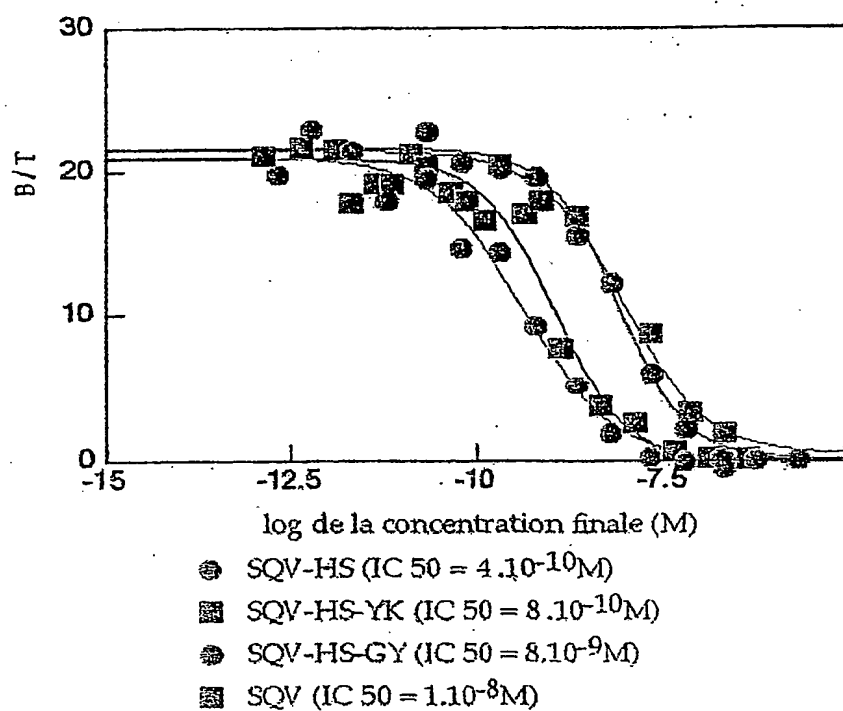
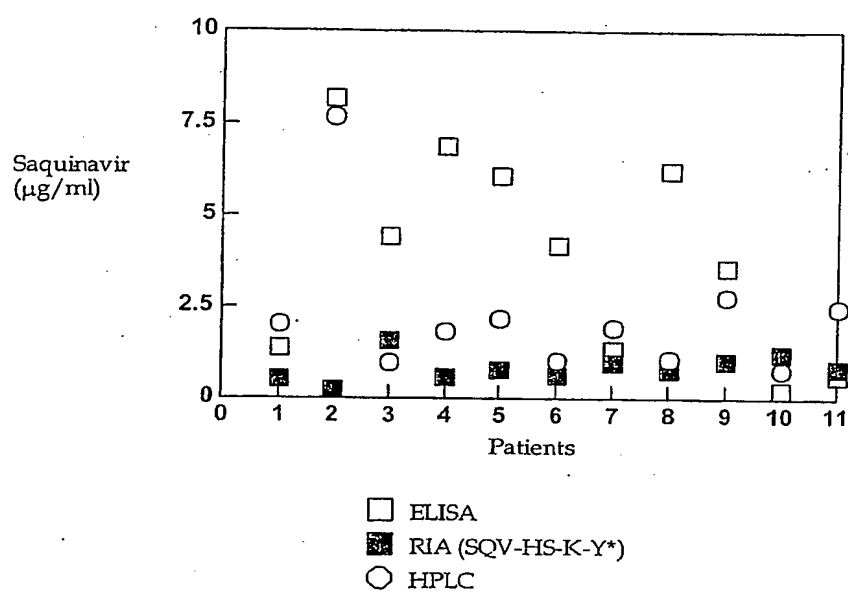


Figure 1B

2/2

Figure 2



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
12 septembre 2003 (12.09.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2003/075010 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
G01N 33/532

(74) Mandataires : BREESÉ, Pierre. etc.; 3 avenue de
l'Opéra, F-75001 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/000707

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international : 5 mars 2003 (05.03.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/02783 5 mars 2002 (05.03.2002) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE -CNRS- [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794
Paris Cedex 16 (FR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : CUPO,
Anny [FR/FR]; 2 avenue Edmont d'Esclevin, F-06160
Juan-Les-Pins (FR). LE SAINT, Cécile [FR/FR]; 34
allée des Micocouliers, Hameau de Puissanton, F-06220
Vallauris (FR). VINCENT, Jean-Pierre [FR/FR]; Le Riou
C, Domaine du Loup, F-06800 Cagnes-sur-Mer (FR).

(88) Date de publication du rapport de recherche
internationale: 6 mai 2004

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: NON-PEPTIDE IMMUNOLOGIC TRACER PRECURSORS COMPRISING A TYROSYL-(X)_N OR LYSINE-(X)_N
TYROSINE MOTIF

(54) Titre : PRECURSEURS DE TRACTEURS IMMUNOLOGIQUES NON-PEPTIDIQUES COMPRENANT UN MOTIF TY-
ROSYL-(X)_N -LYSINE, OU LYSINE-(X)_N-TYROSINE

(57) Abstract: The invention concerns an immunologic tracer characterized in that it comprises a non-peptide hapten coupled with a TYR-(X)_n-LYS or LYS-(X)_n-TYR motif, wherein X is selected among a single bond, an amino acid, except for Lysine, Glutamine, Asparagine or Tyrosine, a succinyl group, a citrate group, a hydroxymethyl-(CH(OH)- group, a methylene group: -CH₂-, an oxygen atom, a sulphur atom, an oxyethylene-CH₂-O- group, or a methylamine -CHNH- group, and n is an integer ranging between 1 and 20, preferably between 1 and 10, more preferably between 1 and 2. The invention also concerns methods for preparing said precursors, the use thereof for preparing immunologic markers useful in competitive immunologic assays.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un précurseur d'un traceur immunologique caractérisé en ce qu'il comprend un haptène non peptidique couplé à un motif TYR (X)_n-LYS ou LYS-(X)_n-TYR dans lequel X est choisi parmi une liaison simple, un acide aminé, à l'exception de Lysine, Glutamine, Asparagine ou Tyrosine, un groupe succinyle, un groupe Citrate, un groupe hydroxyméthyle -CH(OH)-, un groupe méthylène: -CH₂-, un atome d'oxygène, un atome de soufre, un groupe oxyéthylène -CH₂-O-, ou un groupe méthylamine -CHNH- et n est un nombre entier compris entre 1 et 20, de préférence entre 1 et 10, tout préférentiellement entre 1 et 2. L'invention concerne également des procédés de préparation desdits précurseurs l'utilisation de ces derniers pour la préparation de marqueurs immunologiques utiles dans les dosages immunologiques par compétition.

WO 2003/075010 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In Application No
PCT/FR 03/00707A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/532

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 3 925 355 A (PIASIO ROGER N ET AL) 9 December 1975 (1975-12-09) abstract	1-3,5, 10-27
Y	US 5 380 825 A (STENGLEIN KENNETH J ET AL) 10 January 1995 (1995-01-10) abstract; example 18	1-3,5, 10-27
Y	GOUJON LAURE ET AL: "Monitoring of intracellular levels of 5'-monophosphate-AZT using an enzyme immunoassay." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 21, no. 1-2, pages 19-30, XP002230571 ISSN: 0022-1759 cited in the application page 23, column 2 - page 24, column 1	1-3,5, 10-27
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 August 2003

Date of mailing of the international search report

04 12 2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Vadot-Van Geldre, E.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 03/00707

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SELA M ET AL: "Nucleoside-specific antibodies elicited by synthetic antigens." FEDERATION PROCEEDINGS. UNITED STATES 1965 NOV-DEC, vol. 24, no. 6, November 1965 (1965-11), pages 1438-1445, XP008020930 ISSN: 0014-9446 page 1440	1-3,5, 10-19, 21,22, 24-27
A	----- WILTSHIRE ET AL: "Chromatographic and immunochemical approaches to the analysis of the HIV protease inhibitor saguinavir in plasma" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 281, 2000, pages 105-114, XP002196958 ISSN: 0003-2697 page 109	1-3,5, 10-27
A	----- DATABASE WPI Section Ch, Week 199613 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A96, AN 1996-129531 XP002230572 & WO 96 04555 A (BECKMAN INSTR INC) 15 February 1996 (1996-02-15) abstract -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In al Application No
PCT/FR 03/00707

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 3925355	A	09-12-1975	CA 1051870 A1	03-04-1979
			DE 2505267 A1	04-09-1975
			FR 2262670 A1	26-09-1975
			GB 1453583 A	27-10-1976
			JP 50117766 A	16-09-1975

US 5380825	A	10-01-1995	US 5051361 A	24-09-1991
			AU 609001 B2	18-04-1991
			AU 4158389 A	26-04-1990
			FR 2637897 A1	20-04-1990
			GB 2224571 A ,B	09-05-1990

WO 9604555	A	15-02-1996	US 5627080 A	06-05-1997
			CA 2196204 A1	15-02-1996
			DE 69530210 D1	08-05-2003
			EP 0774117 A1	21-05-1997
			JP 10506184 T	16-06-1998
			WO 9604555 A1	15-02-1996

The International Searching Authority has determined that the present international application contains multiple (groups of) inventions, namely:

1. Claims: 1-3 (in part), 5 (in part), 10-19 (in part), 21-22 (in part), 24-27 (in part)

Immunological tracer precursor and immunological tracer characterised in that it includes a nucleoside selected from a list consisting of adenosine, cytidine, deoxycytidine, 2'-deoxyuridine, guanosine, inosine, thymidine and uridine, as a non-peptide hapten bound to a TYR-(X)_n-Lys or LYS-(X)_n-TYR motif, as well as the methods for preparing a tracer precursor and said tracer.

1.1 Claims: 1-3 (in part), 5 (in part), 10-27 (in part)

Immunological tracer precursor and immunological tracer characterised in that it includes a nucleoside analogue (containing a furan grouping (ribose residue)) selected from the list consisting of Acyclovir, S-Adenosyl-L-methionine, 2',3'-dideoxyadenosine (d4T), 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyadenosine (ddA), 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine (3TC), 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT), cordycepin, cytosine-b-D-arabinoside, deoxytubercidin, formycin A, formycin B, puromycin, ribavirin, sangivamycin, tubercidin, 3-fluoro-2',3'-dideoxythymidine (FLT), FdUrd, AraC and fludarabine phosphate as a non-peptide hapten bound to a TYR-(X)_n-Lys or LYS-(X)_n-TYR motif, as well as the methods for preparing a tracer precursor and said tracer.

2. Claims: 1-3 (in part), 6, 10-19 (in part), 21-22 (in part), 24-27 (in part)

Immunological tracer precursor and immunological tracer characterised in that it includes a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) selected from the list including dipyrindodiazepinone, pyridinone, bis(heteroaryl)piperazine, a TSAO derivative, alpha-anilinophenylacetamide (alpha-APA), quinoxaline, benzoxanoninone DMP266 (Efavirenz), benzodiazepine (TIBO) and 1-(2-hydroxyethoxymethyl)-9-(phenylthio)thymine (HEPT) (page 4, line 33-page 5, line 9) as a non-peptide hapten bound to a TYR-(X)_n-Lys or LYS-(X)_n-TYR motif, as well as the methods for preparing a tracer precursor and said tracer.

3. Claims: 1-3 (in part), 7 (in part), 10-19 (in part), 21-22 (in part), 24-27 (in part)

Immunological tracer precursor and immunological tracer characterised in that it includes an anticancer compound selected from the list consisting of cancerostatic alkaloids, as a non-peptide hapten bound to a TYR-(X)_n-Lys or LYS-(X)_n-TYR motif, as well as the methods for preparing a tracer precursor and said tracer.

Note: the term "cancerostatic alkaloids" is unclear (PCT Article 6). The application provides support under the terms of PCT Article 6 and adequate disclosure under the terms of PCT Article 5 for a very small number of such compounds (page 3, line 16: vincristine). In the present case, the claims lack proper support and the application lacks adequate disclosure to such an extent that it is impossible to carry out a meaningful search relating to the entire range covered by the claims.

4. Claims: 1-3 (in part), 4-5 (in part), 7 (in part), 10-19 (in part), 21-22 (in part), 24-27 (in part)

Immunological tracer precursor and immunological tracer characterised in that it includes an antimetabolite as an anticancer compound selected among the pyrimidine base analogues from the list consisting of FUra, as a non-peptide hapten bound to a TYR-(X)_n-Lys or LYS-(X)_n-TYR motif, as well as the methods for preparing a tracer precursor and said tracer.

5. Claims: 1-3 (in part), 4-5 (in part), 7 (in part), 10-19 (in part), 21-22 (in part), 24-27 (in part)

Immunological tracer precursor and immunological tracer characterised in that it includes an antimetabolite as an anticancer compound selected among the purine base analogues from the list consisting of 6-MP and Thi-Gua (sic), as a non-peptide hapten bound to a TYR-(X)_n-Lys or LYS-(X)_n-TYR motif, as well as the methods for preparing a tracer precursor and said tracer.

6. Claims: 1-3 (in part), 5 (in part), 8, 10-27 (in part)

Immunological tracer precursor and immunological tracer characterised in that it includes an antiviral compound selected from the list consisting of carbovir, ganciclovir, saquinavir (SQV), abacavir, indinavir (IDV), nelfinavir (NFV), ritonavir (RTV), amprenavir (APV), lopinavir (LPV), tipranavir, atazanavir, T20 and T22, as a non-peptide hapten bound to a TYR-(X)_n-Lys or LYS-(X)_n-TYR motif, as well as the methods for preparing a tracer precursor and said tracer.

Note: Names such as T20 and T22 do not refer clearly to a specific compound. A search bearing on said compounds will therefore only be

possible in so far as a structure for these compounds is given in the application as filed.

7. Claims: 1-3 (in part), 9 (in part), 10-19 (in part), 21-22 (in part), 24-27 (in part)

Immunological tracer precursor and immunological tracer characterised in that it includes a narcotic selected from the list consisting of cocaine, morphine, heroin and related derivatives thereof, as a non-peptide hapten bound to a TYR-(X)_n-Lys or LYS-(X)_n-TYR motif, as well as the methods for preparing a tracer precursor and said tracer.

8. Claims: 1-3 (in part), 10-19 (in part), 21-22 (in part), 24-27 (in part)

Immunological tracer precursor and immunological tracer characterised in that it includes a drug, as a non-peptide hapten bound to a TYR-(X)_n-Lys or LYS-(X)_n-TYR motif, as well as the methods for preparing a tracer precursor and said tracer.

Note: the term "drug" lacks clarity (PCT Article 6). The application provides support under the terms of PCT Article 6 and adequate disclosure under the terms of PCT Article 5 for a very small number of such compounds. In the present case, the claims lack proper support and the application lacks adequate disclosure to such an extent that it is impossible to carry out a meaningful search relating to the entire range covered by the claims.

9. Claims: 1-3 (in part), 10-19 (in part), 21-22 (in part), 24-27 (in part)

Immunological tracer precursor and immunological tracer characterised in that it includes a non-peptide hormone, as a non-peptide hapten bound to a TYR-(X)_n-Lys or LYS-(X)_n-TYR motif, as well as the methods for preparing a tracer precursor and said tracer.

Note: The term "non-peptide hormone" lacks clarity (PCT Article 6). The application provides support under the terms of PCT Article 6 and adequate disclosure under the terms of PCT Article 5 for a very small number of such compounds. In the present case, the claims lack proper support and the application lacks adequate disclosure to such an extent that it is impossible to carry out a meaningful search relating to the entire range covered by the claims.

10. Claims: 1-3 (in part), 10-19 (in part), 21-22 (in part), 24-27 (in part)

Immunological tracer precursor and immunological tracer characterised in that it includes a neurotransmitter, as a non-peptide hapten bound to a TYR-(X)_n-Lys or LYS-(X)_n-TYR motif, as well as the methods for preparing a tracer precursor and said tracer.

Note: The term "neurotransmitter" lacks clarity (PCT Article 6). The application provides support under the terms of PCT Article 6 and adequate disclosure under the terms of PCT Article 5 for a very small number of such compounds. In the present case, the claims lack proper support and the application lacks adequate disclosure to such an extent that it is impossible to carry out a meaningful search relating to the entire range covered by the claims.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 03/00707

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 G01N33/532

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, PAJ, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	US 3 925 355 A (PIASIO ROGER N ET AL) 9 décembre 1975 (1975-12-09) abrégé	1-3,5, 10-27
Y	US 5 380 825 A (STENGLEIN KENNETH J ET AL) 10 janvier 1995 (1995-01-10) abrégé; exemple 18	1-3,5, 10-27
Y	GOUJON LAURE ET AL: "Monitoring of intracellular levels of 5'-monophosphate-AZT using an enzyme immunoassay." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 21, no. 1-2, pages 19-30, XP002230571 ISSN: 0022-1759 cité dans la demande page 23, colonne 2 - page 24, colonne 1	1-3,5, 10-27

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

20 août 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 551 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé:

Vadot-Van Geldre, E

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 03/00707

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>SELA M ET AL: "Nucleoside-specific antibodies elicited by synthetic antigens." FEDERATION PROCEEDINGS. UNITED STATES 1965 NOV-DEC, vol. 24, no. 6, novembre 1965 (1965-11), pages 1438-1445, XP008020930 ISSN: 0014-9446 page 1440</p>	<p>1-3,5, 10-19, 21,22, 24-27</p>
A	<p>-----</p> <p>WILTSHIRE ET AL: "Chromatographic and immunochemical approaches to the analysis of the HIV protease inhibitor saquinavir in plasma" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 281, 2000, pages 105-114, XP002196958 ISSN: 0003-2697 page 109</p>	<p>1-3,5, 10-27</p>
A	<p>-----</p> <p>DATABASE WPI Section Ch, Week 199613 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A96, AN 1996-129531 XP002230572 & WO 96/04555 A (BECKMAN INSTR INC) 15 février 1996 (1996-02-15) abrégé</p> <p>-----</p>	<p>1</p>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR 03/00707

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}
4. ☒ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}
1-3 (partiellement), 5 (partiellement), 10-19 (partiellement)
21-22 (partiellement), 24-27 (partiellement)

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: claims 1-3 (partiellement), 5 (partiellement),
10-19 (partiellement),
21-22 (partiellement),
24-27 (partiellement)

Précurseur d'un traceur immunologique et traceur immunologique caractérisé en ce qu'il comprend un nucléoside sélectionné de la liste de adénosine, cytidine, deoxycytidine, 2'-deoxyuridine, guanosine, inosine, thymidine et uridine, comme haptène non peptidique couplé à un motif TYR-(X)n-Lys ou LYS-(X)n-TYR, ainsi que les procédés de préparation du précurseur d'un traceur et du traceur.

- 1.1. revendications: claims 1-3 (partiellement), 5 (partiellement),
10-27
(partiellement)

Précurseur d'un traceur immunologique et traceur immunologique caractérisé en ce qu'il comprend un analogue nucléosidique (contenant un groupement furan (résidu du ribose)) sélectionné de la liste de Acyclovir, S-Adenosyl-L-méthionine, 2',3'-dideoxyadénosine (d4T), 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyadénosine (ddA), 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine (3TC), 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT), cordycepine, cytosine-b-D-arabinoside, deoxytubercidine, formycine A, formycine B, puromycine, ribavirine, sangivamycine, tubercidine, 3-fluoro-2',3'-dideoxythymidine (FLT), FdUrd, AraC et fludarabine phosphate comme haptène non peptidique couplé à un motif TYR-(X)n-Lys ou LYS-(X)n-TYR, ainsi que les procédés de préparation du précurseur d'un traceur et du traceur.

2. revendications: claims 1-3 (partiellement), 6, 10-19
(partiellement), 21-22
(partiellement), 24-27
(partiellement)

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Précurseur d'un traceur immunologique et traceur immunologique caractérisé en ce qu'il comprend un inhibiteur non-nucléosidique de la transcriptase inverse INNTI sélectionné de la liste de dipyridodiazépinone, une pyridinone, une bis(hétéroaryl)pipérazine, un dérivé TSAO, une alpha-anilinophénylacétamide (alpha-APA), la quinoxaline, la benzoxanoninone DMP266 (Efavirenz), benzodiazépine (TIBO) et 1-(2-hydroxyéthoxyméthyl)-9-(phénylthio)thymine (HEPT) (page 4, ligne 33-page 5, ligne 9) comme haptène non peptidique couplé à un motif TYR-(X)n-Lys ou LYS-(X)n-TYR, ainsi que les procédés de préparation du précurseur d'un traceur et du traceur.

3. revendications: claims 1-3 (partiellement), 7 (partiellement),
10-19 (partiellement),
21-22 (partiellement),
24-27 (partiellement)

Précurseur d'un traceur immunologique et traceur immunologique caractérisé en ce qu'il comprend un composé anticancéreux sélectionné de la liste des alcaloïdes cancérostatiques, comme haptène non peptidique couplé à un motif TYR-(X)n-Lys ou LYS-(X)n-TYR, ainsi que les procédés de préparation du précurseur d'un traceur et du traceur.

Remarque : le terme "alcaloïdes cancerostatiques" manque clarté (art. 6 PCT). La demande fournit un fondement au sens de l'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT que pour un nombre très limité de tels composés (page 3, ligne 16 : vincristine). Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d'exposé à un point tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible.

4. revendications: claims 1-3 (partiellement), 4-5 (partiellement),
7 (partiellement), 10-19
(partiellement), 21-22
(partiellement),
24-27 (partiellement)

Précurseur d'un traceur immunologique et traceur immunologique caractérisé en ce qu'il comprend un antimétabolite comme composé anticancéreux choisi parmi les analogues de bases pyrimidiques sélectionné de la liste de FUra, comme haptène non peptidique couplé à un motif TYR-(X)n-Lys ou LYS-(X)n-TYR, ainsi que les procédés de préparation du précurseur d'un traceur et du traceur.

5. revendications: claims 1-3 (partiellement), 4-5 (partiellement),

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUS SUR PCT/ISA/ 210

24-27 (partiellement)
 7 (partiellement), 10-19
 (partiellement), 21-22
 (partiellement),

Précurseur d'un traceur immunologique et traceur immunologique caractérisé en ce qu'il comprend un antimétabolite comme composé anticancéreux choisi parmi les analogues de bases puriques sélectionné de la liste de 6-MP et Thi-Gua (sic), comme haptène non peptidique couplé à un motif TYR-(X)n-Lys ou LYS-(X)n-TYR, ainsi que les procédés de préparation du précurseur d'un traceur et du traceur.

6. revendications: claims 1-3 (partiellement), 5 (partiellement), 8, 10-27 (partiellement)

Précurseur d'un traceur immunologique et traceur immunologique caractérisé en ce qu'il comprend un composé antiviral sélectionné de la liste de carbovir, ganciclovir, saquinavir (SQV), abacavir, indinavir (IDV), nelfinavir (NFV), ritonavir (RTV), amprenavir (APV), lopinavir (LPV), tipranavir, atazanavir, T20 et T22, comme haptène non peptidique couplé à un motif TYR-(X)n-Lys ou LYS-(X)n-TYR, ainsi que les procédés de préparation du précurseur d'un traceur et du traceur.

Remarque : Noms comme T20 et T22 ne réfèrent pas clairement à un composé spécifique. Une recherche sur ces composés sera donc seulement possible dans la mesure où une structure pour ces composés est disponible dans la demande comme déposée.

7. revendications: claims 1-3 (partiellement), 9, 10-19
~~(partiellement), 21-22-~~
~~(partiellement), 24-27~~
 (partiellement)

Précurseur d'un traceur immunologique et traceur immunologique caractérisé en ce qu'il comprend un stupéfiant sélectionné de la liste de cocaïne, morphine, héroïne et leurs dérivés apparentés, comme haptène non peptidique couplé à un motif TYR-(X)n-Lys ou LYS-(X)n-TYR, ainsi que les procédés de préparation du précurseur d'un traceur et du traceur.

8. revendications: claims 1-3 (partiellement), 10-19
 (partiellement), 21-22
 (partiellement), 24-27
 (partiellement)

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Précurseur d'un traceur immunologique et traceur immunologique caractérisé en ce qu'il comprend une drogue, comme haptène non peptidique couplé à un motif TYR-(X)n-Lys ou LYS-(X)n-TYR, ainsi que les procédés de préparation du précurseur d'un traceur et du traceur.

Remarque : le terme "drogue" manque clarté (art. 6 PCT). La demande ne fournit aucun fondement au sens de l'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT pour de tels composés. Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d'exposé à un point tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible.

9. revendications: claims 1-3 (partiellement), 10-19
 (partiellement), 21-22
 (partiellement), 24-27
 (partiellement)

Précurseur d'un traceur immunologique et traceur immunologique caractérisé en ce qu'il comprend une hormone non-peptidique, comme haptène non peptidique couplé à un motif TYR-(X)n-Lys ou LYS-(X)n-TYR, ainsi que les procédés de préparation du précurseur d'un traceur et du traceur.

Remarque : le terme "hormone non-peptidique" manque clarté (art. 6 PCT). La demande ne fournit aucun fondement au sens de l'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT pour de tels composés. Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d'exposé à un point tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible.

10. revendications: claims 1-3 (partiellement), 10-19
 (partiellement), 21-22
 (partiellement), 24-27
 (partiellement)

Précurseur d'un traceur immunologique et traceur immunologique caractérisé en ce qu'il comprend un neuromédiateur, comme haptène non peptidique couplé à un motif TYR-(X)n-Lys ou LYS-(X)n-TYR, ainsi que les procédés de préparation du précurseur d'un traceur et du traceur.

Remarque : le terme "neuromédiateur" manque clarté (art. 6 PCT). La demande ne fournit aucun fondement au sens de l'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT pour de tels composés. Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d'exposé à un point tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Internationale No

PCT/FR 03/00707

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 3925355	A	09-12-1975	CA 1051870 A1	03-04-1979
			DE 2505267 A1	04-09-1975
			FR 2262670 A1	26-09-1975
			GB 1453583 A	27-10-1976
			JP 50117766 A	16-09-1975

US 5380825	A	10-01-1995	US 5051361 A	24-09-1991
			AU 609001 B2	18-04-1991
			AU 4158389 A	26-04-1990
			FR 2637897 A1	20-04-1990
			GB 2224571 A ,B	09-05-1990

WO 9604555	A	15-02-1996	US 5627080 A	06-05-1997
			CA 2196204 A1	15-02-1996
			DE 69530210 D1	08-05-2003
			EP 0774117 A1	21-05-1997
			JP 10506184 T	16-06-1998
			WO 9604555 A1	15-02-1996

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.